

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO A LASER DE $\lambda 808$ nm E $\lambda 660$ nm
NO PROCESSO DE REPARO PERIODONTAL DE DENTES
REIMPLANTADOS EM RATOS

Aracaju
Janeiro/2016

FELIPE DE SOUZA MATOS

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO A LASER DE $\lambda 808$ nm E $\lambda 660$ nm
NO PROCESSO DE REPARO PERIODONTAL DE DENTES
REIMPLANTADOS EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro

Aracaju

2016

ii

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M433e Matos, Felipe de Souza
 Efeito da fotobiomodulação a laser de 808 nm e 660 nm no
 processo de reparo periodontal de dentes reimplantados em ratos /
 Felipe de Souza Matos; orientador Maria Amália Gonzaga Ribeiro.
 – Aracaju, 2016.
 67 f.: il.

 Dissertação (mestrado em Odontologia) – Universidade
 Federal de Sergipe, 2016.

 1. Avulsão dentária. 2. Reimplante dentário. 3. Lasers. 4.
 Dentes – Raízes – Reabsorção I. Ribeiro, Maria Amália Gonzaga,
 orient. II. Título.

CDU 616.314-089.843




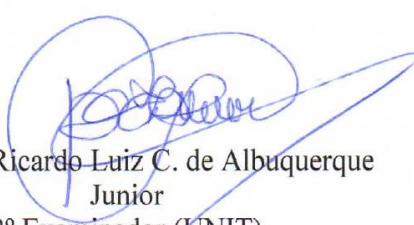
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

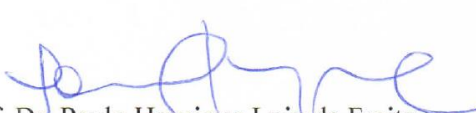
Ata da sessão de Defesa de Dissertação
de Mestrado de **FELIPE DE SOUZA
MATOS**


Às quatorze horas do dia vinte e nove de Janeiro de dois mil e dezesseis, realizou-se no auditório do CCBS/HU, Campus da Saúde da Universidade Federal de Sergipe, a sessão pública de defesa de dissertação de Mestrado em Odontologia de **FELIPE DE SOUZA MATOS** sob o título: “**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO A LASER DE 808 NM E 660 NM NO PROCESSO DE REPARO PERIODONTAL DE DENTES REIMPLANTADOS**” presidido pela Prof.^a Dr.^a Maria Amália Gonzaga Ribeiro, na qualidade de Orientadora, que por sua vez passou a palavra ao candidato para proceder a apresentação do seu trabalho. Logo após, o primeiro examinador, Prof. Dr. Paulo Henrique Luiz de Freitas, arguiu o candidato que teve igual período para defesa. O mesmo aconteceu com o segundo examinador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior. Em seguida, a Prof.^a Dr.^a Maria Amália Gonzaga Ribeiro, orientadora do candidato, teceu comentários sobre o trabalho apresentado. Encerrada esta etapa, os presentes retiraram-se do recinto, permanecendo apenas a banca examinadora para avaliação. Após esta, a banca decidiu considerar o candidato **APROVADO**. Nada mais havendo a tratar, a presente ata foi lavrada e, depois de lida e aprovada, será assinada pela banca examinadora e pelo mestrando.

Aracaju, 29 de Janeiro de 2016

Prof.^a Dr.^a Maria Amália Gonzaga Ribeiro

Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Luiz C. de Albuquerque
Junior

2º Examinador (UNIT)

Prof. Dr. Paulo Henrique Luiz de Freitas

1ª Examinador (UFS)

Felipe de Souza Matos

Mestrando

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Humberto Jorge Goes Matos** e **Ismênia de Souza Matos**, pela formação humana, amor, incentivo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu refúgio e minha fortaleza.

A minha **família**, em especial meus irmãos **Elielba**, **Elaine** e **Jonatan**, pela união, carinho e amizade.

Ao **Alfrancio**, que de forma especial me deu força e coragem, apoiando-me nos momentos de dificuldades.

A todos os **amigos, colegas do mestrado e da especialização** em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Pernambuco pela amizade, motivação e momentos de descontração durante essa jornada.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro**, por seus ensinamentos, paciência, segurança, competência e por contribuir na minha formação como docente e pesquisador, desde a graduação. Obrigado pela oportunidade e confiança depositada em mim.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior** pela contribuição intelectual e apoio estrutural para execução metodológica deste trabalho no Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental do Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes (UNIT), permitindo que esta pesquisa pudesse ser realizada.

Ao **Prof. Dr. Luiz Renato Paranhos** pelos valiosos ensinamentos, pela amizade e grande contribuição em minha formação.

Ao **Prof. Dr. José Mirabeau de Oliveira Ramos** pela atenção e orientação durante a realização das atividades clínicas.

À **Profa. Maria Helena Ribeiro** pelo conhecimento compartilhado, carinho e incentivo constante.

Ao Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS), na pessoa da **Profa. Dra. Alaíde Hermínia de Aguiar Oliveira**, pela oportunidade de trabalhar como Professor Colaborador Voluntário na disciplina de Endodontia, proporcionando-me experiência e crescimento profissional.

Aos professores membros da banca de qualificação do projeto de pesquisa e da dissertação, **Prof. Dr. André Luís Faria e Silva, Profa. Dra. Marta Rabello Piva, Prof. Dr. Paulo Henrique Luiz de Freitas, Prof. Dr. Paulo Ricardo Saquete Martins Filho e Profa. Dra. Sandra Regina Barretto** pelas sugestões pertinentes e críticas construtivas que engrandeceram este trabalho.

Às acadêmicas do curso de Odontologia da UFS, **Fernanda Godolphim, Camila Araújo e Camila Muniz**, pela inestimável colaboração na execução da parte experimental deste trabalho.

A toda **equipe do Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental** do Instituto de Tecnologia e Pesquisa da UNIT, em especial **Rose Nely e Rafael Valois**, pelo acolhimento e colaboração durante a execução da pesquisa.

Aos **funcionários do biotério** da UNIT.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PRODONTO)** por permitir o desenvolvimento de minha pesquisa e formação acadêmica.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio da bolsa de estudos durante o curso.

À **Universidade Federal de Sergipe**, seu **corpo docente, direção e administração**.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução desta pesquisa. Muito obrigado!

“O conhecimento exige uma presença curiosa do sujeito em face do mundo. Requer uma ação transformadora sobre a realidade. Demanda uma busca constante. Implica em invenção e em reinvenção.”

Paulo Freire

RESUMO

O reimplante dental é considerado o tratamento ideal nos casos de traumatismo dentoalveolar com avulsão. No entanto, mesmo respeitando as condições ideais de tempo extra-alveolar ou de armazenamento, grande parte dos dentes reimplantados é perdida principalmente pela ocorrência de reabsorção radicular externa. Dessa forma, este trabalho avaliou, por meio de análise histomorfométrica, o efeito da fotobiomodulação a laser (FBML) de $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm e de meios de armazenamento no processo de reparo periodontal de reimplantes dentais em ratos. A pesquisa foi desenvolvida no modelo de estudo experimental *in vivo*, randomizado e com cegamento simples. Incisivos superiores direitos foram extraídos de sessenta ratos *Wistar* e distribuídos aleatoriamente em seis grupos ($n = 10$): GP, LI e LS, nos quais os dentes foram armazenados em guardanapo de papel, leite integral e leite de soja, respectivamente, por 45 minutos; e GPL, LIL e LSL, nos quais os dentes foram armazenados nos mesmos meios, mas a superfície radicular e o alvéolo foram tratados com FBML $\lambda 808$ nm antes do reimplante (AsGaAl, CW, 100 mW, 61 J/cm^2), e a mucosa vestibular e palatina do alvéolo com FBML $\lambda 660$ nm após o reimplante (InGaAlP, CW, 100 mW, 61 J/cm^2). Cinco ratos de cada grupo foram eutanasiados após 15 ou 30 dias. A hemimaxila direita incluindo o incisivo reimplantado foi removida e processada para análise histomorfométrica de áreas de reabsorção radicular, reabsorção com substituição, perímetro com anquilose e reparo periodontal, e áreas de deposição de colágeno tipo I e III, utilizando o programa ImageJ 1.50b. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey* ($\alpha = 5\%$). Todos os dados apresentaram distribuição normal segundo o teste de *Shapiro-Wilk*. LI e LS apresentaram menores áreas de reabsorção radicular e maior deposição de colágeno em ambos os períodos experimentais e LS o maior perímetro de reparo. A FBML reduziu a ocorrência de reabsorção radicular apenas no grupo GPL, tanto em 15 quanto em 30 dias, e aumentou o perímetro de reparo periodontal em todos os grupos em 30 dias. Houve maior deposição de colágeno nos grupos irradiados independente do período experimental. Concluiu-se que o protocolo de FBML de $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm, bem como leite integral e leite de soja favoreceram o processo de reparo periodontal de reimplantes dentais em ratos.

Palavras-chave: Avulsão dentária; Reimplante dentário; Lasers.

ABSTRACT

The tooth replantation is considered the ideal treatment in cases of dentoalveolar trauma with avulsion. However, even respecting the optimal conditions of extra-alveolar time or storage, much of the replanted teeth is lost mainly by the occurrence of external root resorption. Thus, this study evaluated through histomorphometric analysis the effect of laser photobiomodulation (LPBM) at $\lambda 808$ nm and $\lambda 660$ nm and of storage media on the periodontal repair process of replanted teeth in rats. The research was conducted on the *in vivo* experimental study design, randomized and with simple blinding. Maxillary right incisors were extracted from sixty *Wistar* rats and randomly assigned to six groups ($n = 10$): PN, WM and SM, in which the teeth were stored in paper napkin, whole milk and soy milk, respectively, for 45 minutes; and PNL, WML and SML, in which the teeth were stored in the same storage media, but the root surface and the alveolus were treated with LPBM at $\lambda 808$ nm before the replantation (GaAlAs, CW, 100 mW, 61 J/cm^2) and the buccal and palatal mucosa of the alveolus with LPBM at $\lambda 660$ nm after the replantation (InGaAlP, CW, 100 mW, 61 J/cm^2). Five rats from each group were euthanized after 15 or 30 days. The right hemimaxilla including the replanted incisor was removed and processed for histomorphometric analysis of inflammatory root resorption areas, replacement root resorption areas, perimeter with ankylosis and periodontal repair, and areas of type I and III collagen deposition, using the ImageJ 1.50b software. Data were analyzed statistically by the ANOVA test followed by *Tukey's* multiple comparison test ($\alpha = 5\%$). All data presented normal distribution according to the *Shapiro-Wilk* test. WM and SM showed smaller root resorption areas and higher collagen deposition in both experimental periods and SM the greatest perimeter of repair. LPBM reduced the occurrence of root resorption only in PNL group, both in 15 and in 30 days, and increased the perimeter of periodontal repair in all groups at 30 days. There was higher collagen deposition in the irradiated groups independent of the experimental period. It was concluded that the LPBM protocol at $\lambda 808$ nm and $\lambda 660$ nm, as well as whole milk and soy milk favored the periodontal repair process of replanted teeth in rats.

Key words: Tooth avulsion; Tooth replantation; Lasers.

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Proposição	14
3. Metodologia	15
3.1 Aspectos éticos	15
3.2 Modelo de estudo	15
3.3 Local da pesquisa	15
3.4 Amostra	15
3.5 Condições locais e de acomodação	16
3.6 Grupos	16
3.7 Procedimento cirúrgico	17
3.7.1 Extração dos incisivos	17
3.7.2 Tratamento dos incisivos pós-exodontia	18
3.7.3 Fotobiomodulação a laser e reimplante dental	20
3.7.4 Eutanásia e obtenção das peças cirúrgicas	23
3.8 Processamento histológico	24
3.9 Análise histomorfométrica	24
3.10 Análise estatística	25
4. Resultados	27
5. Considerações finais	47
6. Comunicado de imprensa (<i>press release</i>)	48
Referências	49
Anexo 1	53
Anexo 2	54

1 INTRODUÇÃO

A lesão traumática ao complexo dentoalveolar pode ser definida como uma agressão térmica, química ou mecânica sofrida por três estruturas básicas do sistema estomatognático: os dentes, a porção alveolar e os tecidos moles adjacentes, sendo que sua severidade depende do tipo, intensidade e duração do impacto (Duarte *et al.*, 2001). Tais lesões podem ocasionar fratura, deslocamento parcial ou total dos dentes, rompimento ou esmagamento dos tecidos de suporte e, a depender do impacto traumático, fraturas dos ossos da face e até mesmo danos cerebrais e em região de pescoço, resultando em distúrbios funcionais, estéticos e psicossociais ao paciente (Mori *et al.*, 2007).

Entre todos os tipos de trauma dentoalveolar, a avulsão dental, caracterizada pelo deslocamento completo do dente para fora do seu alvéolo, corresponde a 0,5% a 16% (Baginska & Wilczynska-Borawska, 2012) e é considerada uma das mais graves (Andersson *et al.*, 2012). Seu prognóstico depende das ações tomadas no local do acidente e imediatamente após o trauma, pois a partir de uma abordagem inicial adequada e no tempo apropriado, pode-se limitar os danos sofridos pelo paciente e prevenir o surgimento de sequelas (Petrovic *et al.*, 2010). O tratamento ideal, nesses casos, é o reimplante imediato do dente avulsionado, ou seja, o reposicionamento do dente em seu alvéolo, possibilitando o restabelecimento da estética e função (Andersson *et al.*, 2012).

Porém, na prática, nem sempre é possível realizar tal procedimento, seja em razão da dimensão do trauma, que coloca a vida do paciente em risco, ou da complexidade da lesão na área e, ainda, da falta de conhecimento sobre a possibilidade de reimplante (Andreasen *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 2012). Dessa forma, dois fatores que devem ser considerados para favorecer o prognóstico do reimplante são: o meio em que o dente é armazenado até o seu reimplante e o tempo que ele permanece fora do alvéolo, sendo este último inversamente proporcional à possibilidade de sucesso (Petrovic *et al.*, 2010).

Diferentes meios têm sido propostos para armazenamento de dentes avulsionados a fim de manter a viabilidade das células presentes sobre a superfície dental, sua capacidade de aderência e multiplicação, favorecendo a regeneração do ligamento periodontal (dos Santos *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2010; Sottovia *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2011; Moazami *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Moura *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2014). Dentre eles, a Solução Balanceada de Hanks (HBSS) e o Viaspan[®] são os mais

indicados por conterem todos os metabólitos essenciais para a manutenção celular, com taxas de sucesso de 90%. No entanto, não se tratam de meios de armazenamento prontamente acessíveis (Malhotra, 2011; Udoyce *et al.*, 2012). Por outro lado, leite bovino integral e, mais recentemente, leite de soja, têm sido amplamente aceitos como meios de armazenamento adequados para dentes avulsionados, por apresentarem eficácia clínica equivalente ao HBSS, com a vantagem de serem facilmente encontrados (dos Santos *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2011; Moazami *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Moura *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2014).

Ainda assim, mesmo respeitando as condições ideais de tempo e armazenamento extra-alveolar, o sucesso do reimplante dental é limitado. Grande parte dos dentes reimplantados é perdida principalmente pela ocorrência de reabsorção radicular externa, o que incita a busca por outras estratégias de tratamento, como a laserterapia, na tentativa de prevenir ou minimizar as complicações decorrentes do trauma e, conseqüentemente, manter o dente no alvéolo por um período mais longo (Haypek *et al.*, 2006; Hamaoka *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Hecova *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Vilela *et al.*, 2012).

Os possíveis benefícios da laserterapia no reparo periodontal de dentes reimplantados têm sido considerados com base no princípio da bioestimulação promovida pelo laser (Almeida-Lopes & Lopes, 2006). Esse fenômeno ocorre por meio de efeitos fotoquímicos, não térmicos, gerados em função de moléculas com propriedades fotorreceptoras distribuídas nas células, como as flavoproteínas, porfirinas, citocromo, tirosina e asparagina que, ao receberem radiação com comprimento de onda específico, provocam variações no metabolismo celular e promovem ações de natureza analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante (Rocha Júnior *et al.*, 2007).

Assim, embora a ação da fototerapia a laser sobre os tecidos biológicos já seja um assunto amplamente investigado, existe escassez de estudos no que se refere ao seu efeito sobre o processo de reparo periodontal de reimplantes dentais. Aliado a isso, tem-se a falta de consenso e determinação do meio mais apropriado e ao mesmo tempo acessível para armazenamento de dentes avulsionados até o seu reimplante, o que torna esta pesquisa relevante.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo avaliou o efeito da fotobiomodulação a laser de $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm e de meios de armazenamento no processo de reparo periodontal de reimplantes dentais em ratos.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes (Anexo 1), sob o processo de número 041114, assegurando que todos os princípios legais e éticos da experimentação animal foram seguidos, conforme disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Modelo de estudo

A pesquisa foi desenvolvida no modelo de estudo analítico intervencional, quantitativo, experimental *in vivo*, randomizado, com cegamento simples e fatorial (meio de conservação, fotobiomodulação a laser e tempo).

3.3 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada em duas etapas: a primeira, referente aos procedimentos experimentais cirúrgicos, executada no Laboratório de Cirurgia do Biotério da Universidade Tiradentes (UNIT), e a segunda, referente ao processamento e exame histológicos, realizada no Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental (LMPE) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) da UNIT.

3.4 Amostra

Foram utilizados 60 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar), com idade aproximada de dois meses, pesando entre 200 e 250 g, em bom estado de saúde, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes.

3.5 Condições locais e de acomodação

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas retangulares de dimensões 49x34x16 cm (comprimento x largura x altura) com cinco animais em cada, em sala climatizada com temperatura controlada aproximada de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas. As gaiolas foram forradas com maravalha, sendo trocadas diariamente, e os animais receberam água *ad libitum* e dieta padrão Labina[®] (Purina, São Paulo, SP, Brasil).

3.6 Grupos

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos, cada grupo composto por 10 animais, como descrito na tabela 1. Após o procedimento de reimplante, cada grupo foi subdividido em dois grupos de cinco animais cada, de acordo com os períodos experimentais de eutanásia em 15 e 30 dias (Mori *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012; Vilela *et al.*, 2012). A distribuição randomizada dos animais em seus respectivos grupos foi realizada através da seleção de um envelope lacrado, opaco e numerado de 1 a 60. Para cada numeração existia um código correspondente ao grupo (GP, GPL, LI, LIL, LS ou LSL) e período experimental (15 ou 30 dias). Os números foram ordenados aleatoriamente nos respectivos grupos através do gerador de sequência RANDOM.ORG (www.random.org). Os primeiros 10 números foram alocados para o grupo GP, em seguida para os grupos GPL, LI, LIL, LS e LSL, sucessivamente.

Tabela 1. Grupos de estudo.

Grupos	Tratamento da superfície dental e do alvéolo	n	Eutanásia
GP	Armazenamento em guardanapo de papel	10	15 dias 30 dias
GPL	Armazenamento em guardanapo de papel + FBML*	10	15 dias 30 dias
LI	Armazenamento em leite integral	10	15 dias 30 dias
LIL	Armazenamento em leite integral + FBML*	10	15 dias 30 dias
LS	Armazenamento em leite de soja	10	15 dias 30 dias
LSL	Armazenamento em leite de soja + FBML*	10	15 dias 30 dias

*Fotobiomodulação a Laser

3.7 Procedimento cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados utilizando instrumental cirúrgico organizado em conjuntos individuais, esterilizados em autoclave, fazendo-se uso de equipamentos de proteção individual, respeitando todos os princípios de biossegurança.

3.7.1 Extração dos incisivos

Os animais foram submetidos à anestesia geral com injeção intraperitoneal de uma mistura de Cloridrato de Cetamina 10% (Cetamin, Syntec do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil) e Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin, Syntec do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil), na proporção de 0,75/0,5 mL e em uma dose de 0,1 mL por 100 g de peso corporal, utilizando seringa e agulha estéreis descartáveis para insulina (Saldanha Rodrigues Ltda., Flores Manaus, AM, Brasil).

Logo após, foram posicionados em decúbito dorsal para realização da antisepsia intraoral da porção anterior da maxila com Gluconato de Clorexidina a 0,12% (Colgate-Palmolive Industrial Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil), utilizando uma haste flexível com ponta de algodão esterilizada (Johnson & Johnson Industrial Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 1).



Figura 1 – Antissepsia intraoral da porção anterior da maxila.

Para a sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito de cada rato, foi utilizado um descolador de Buser (Trinity Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e um fórceps de número 150 adulto adaptado (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda.,

São Caetano do Sul, SP, Brasil), no qual foi confeccionado um sulco na sua parte ativa para melhor apreensão da coroa do incisivo do rato (Figura 2).

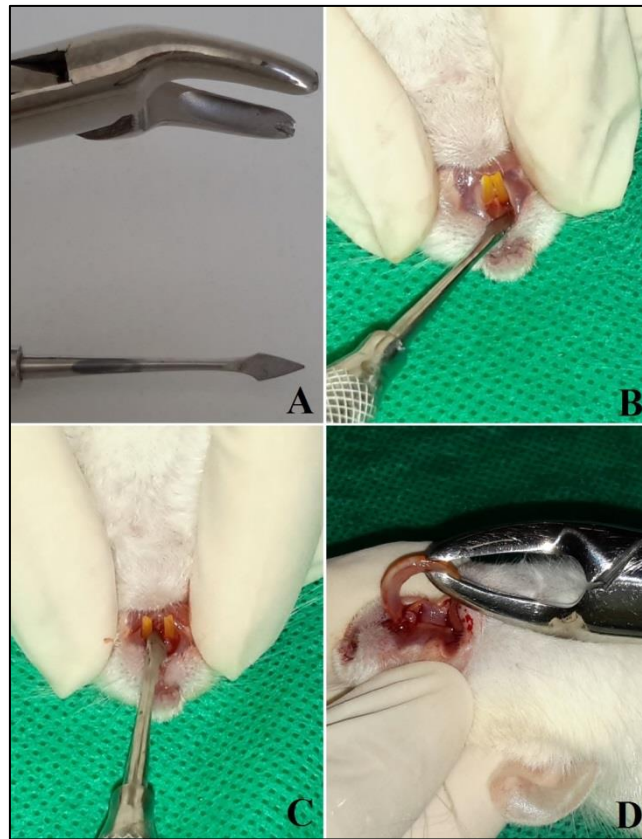


Figura 2 – A) Instrumentos utilizados para sindesmotomia, luxação e extração. B) Sindesmotomia. C) Luxação do incisivo superior direito. D) Extração do incisivo superior direito.

3.7.2 Tratamento dos incisivos pós-exodontia

Nos grupos GP e GPL, após a exodontia, os dentes foram armazenados em guardanapo de papel (Santher[®] - Fábrica de Papel Santa Therezinha S.A., Bragança Paulista, SP, Brasil) durante 45 minutos (Figura 3A) (Saito *et al.*, 2011). Nos grupos LI e LIL, os dentes foram mantidos em 20 mL de leite bovino UHT integral (Italac, Santa Helena de Goiás, GO, Brasil) (Figura 3B), e, nos grupos LS e LSL, em 20 mL de leite de soja (Sollys Original, Nestlé, Araras, SP, Brasil) (Figura 3C), em temperatura ambiente ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e em copos plásticos descartáveis individuais com capacidade de 50 mL (Canguru S/A Indústria e Comércio de Produtos Plásticos, Três Corações, MG, Brasil), por um período de 45 minutos.



Figura 3 – A) Incisivo superior direito armazenado em guardanapo de papel. B) Incisivo superior direito armazenado em leite bovino UHT integral. C) Incisivo superior direito armazenado em leite de soja.

Com o objetivo de controlar o crescimento contínuo do incisivo dos ratos e a necrose do tecido pulpar posterior à extração, decorridos 45 minutos de permanência em seus respectivos meios de armazenamento, a papila dental de cada dente extraído foi removida com lâmina de bisturi número 15 (Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltda., Beiqiao Town, Suzhou City, China) (Figura 4A) e a polpa extirpada via forame apical com o auxílio de uma lima Hedstroem número 20 de 25 mm pré-curvada (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), apreendendo o dente pela porção coronária por meio de uma pinça clínica (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) (Figura 4B).

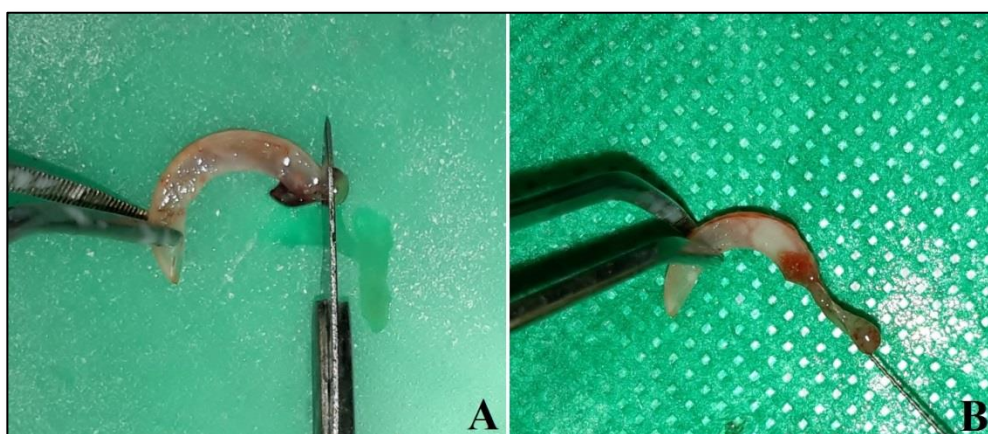


Figura 4 – A) Remoção da papila dental. B) Extirpação da polpa via forame apical.

Subsequentemente, através da abertura foraminal, os canais radiculares foram irrigados com 5 mL de solução fisiológica (Farmax, Divinópolis, MG, Brasil) utilizando seringa e agulha estéreis descartáveis de 5 mL (Becton Dickinson Ind. Cirúr. Ltda., Curitiba, PR, Brasil) (Figura 5A), secos com pontas de papel absorvente esterilizadas número 20

(Dentsply Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) (Figura 5B) e preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (UltraCal[®] XS, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) com auxílio de pontas Capillary Tip 0.014” de 25 mm (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) (Figura 5C). O tempo médio para a realização desses procedimentos foi de 1 minuto.

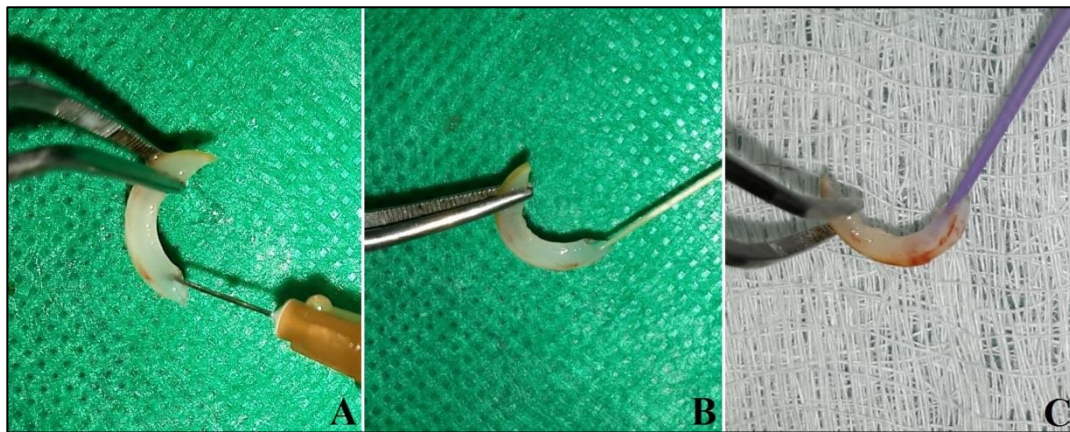


Figura 5 – A) Irrigação do canal radicular via forame apical. B) Secagem do canal radicular. C) Preenchimento do canal radicular com pasta de hidróxido de cálcio.

3.7.3 Fotobiomodulação a laser e reimplante dental

Previamente ao reimplante dos dentes em seus alvéolos, realizou-se uma nova antisepsia da região anterior da maxila com Gluconato de Clorexidina a 0,12% (Figura 6A) e lavagem do alvéolo com 2 mL de solução fisiológica, utilizando seringa e agulha estéreis descartáveis de 5 mL, para a remoção do coágulo (Figura 6B). Nos grupos GPL, LIL e LSL foi aplicado laser infravermelho de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) de $\lambda 808$ nm (Photon Lase III[®], DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil) em 3 pontos (terços cervical, médio e apical) da superfície radicular mesial e distal dos incisivos extraídos e na entrada do alvéolo (Figuras 6C e 6D), conforme parâmetros contidos na Tabela 2. O reimplante dental foi realizado com auxílio de uma pinça clínica, em movimento lento e delicado, verificando o correto posicionamento do dente no interior do alvéolo (Figura 6E). Após o reimplante, nenhuma contenção foi realizada, uma vez que a própria conformação anatômica do dente e de seu alvéolo é suficiente para mantê-lo em sua posição original (Figura 6F) (dos Santos *et al.*, 2009; Ricieri *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2010).

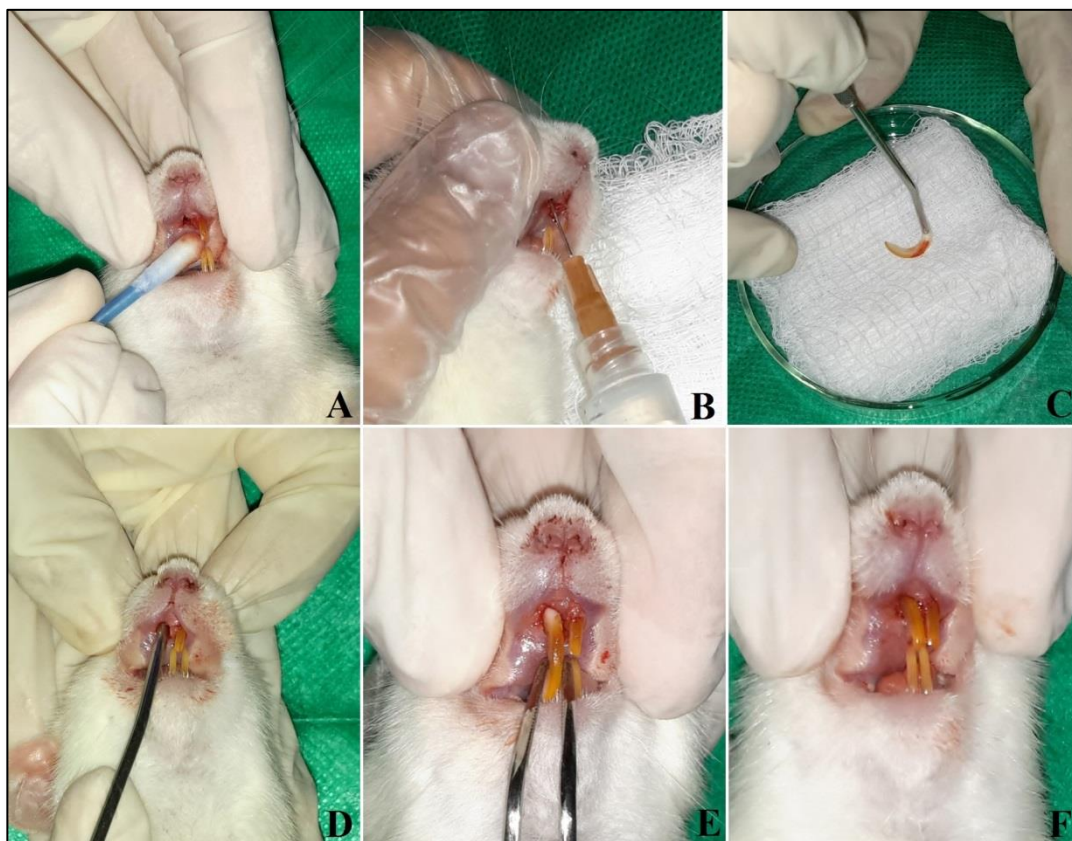


Figura 6 – A) Antissepsia da região anterior da maxila previamente ao reimplante. B) Lavagem do alvéolo. C) Irradiação laser na superfície dentária. D) Irradiação laser no interior do alvéolo. E) Reimplante dental. F) Incisivo superior direito reimplantado.

Nos grupos GPL, LIL e LSL foi ainda aplicado laser vermelho de Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP) de $\lambda 660$ nm (Photon Lase III[®], DMC Equipamentos LTDA, São Carlos, SP, Brasil) em um ponto na mucosa vestibular e palatina do alvéolo contendo o dente reimplantado (Figuras 7A e 7B), imediatamente após o reimplante e a cada 48 horas até completar cinco sessões (Tabela 2). Para a realização deste procedimento, os animais foram anestesiados com a mesma substância utilizada no procedimento cirúrgico, sendo aplicado um terço da dose utilizada para a exodontia, em função da menor duração do procedimento.



Figura 7 – A) Irradiação laser na mucosa vestibular do alvéolo contendo o dente reimplantado. B) Irradiação laser na mucosa palatina do alvéolo contendo o dente reimplantado.

Os animais receberam dose única intramuscular de uma associação antibiótica (Megacilin Super Plus, Vansil Ind. Com. e Repr. Ltda., Descalvado, SP, Brasil) diluída em 15 mL de água para injeção estéril (Samtec Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil), na posologia de 0,005mL/100g, de acordo com a recomendação do fabricante (Mori *et al.*, 2010), utilizando seringa para insulina e agulha hipodérmica estéreis descartáveis. Nas primeiras 12 horas pós-reimplante, os animais receberam apenas água; depois, foram alimentados com ração triturada úmida até completar 72 horas, quando então a alimentação voltou ao normal.

Tabela 2 - Protocolo da fotobiomodulação a laser.

Parâmetros de irradiação	Antes do reimplante	Após o reimplante
Comprimento de onda	808 nm	660 nm
Meio ativo	AsGaAl	InGaAlP
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo
Modo de aplicação	Contato, pontual	Contato, pontual
Potência de saída	100 mW	100 mW
Diâmetro do ponto do feixe	1,9 mm	1,9 mm
Área do feixe de laser	0.028 cm ²	0.028 cm ²
Densidade de potência	3,6 W/cm ²	3,6 W/cm ²
Densidade de energia	61 J/cm ²	61 J/cm ²
Tempo de irradiação por ponto	17 s	17 s
Tempo total de irradiação	119 s	34 s
Energia total por ponto	1,7 J	1,7 J
Divergência do feixe perpendicular à junção	17°	17°
Ângulo da ponta	50°	50°

3.7.4 Eutanásia e obtenção das peças cirúrgicas

Os animais foram eutanasiados de acordo com os períodos experimentais de 15 e 30 dias após reimplante pelo método químico inalatório, em câmara de gás de dióxido de carbono, seguindo as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA.

Após a constatação da morte do animal, indicada pela ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos, perda do reflexo corneal e mucosas pálidas, a maxila foi dissecada utilizando uma lâmina de bisturi número 15 e a porção anterior da maxila removida por meio de um corte com uma tesoura de Metzembaun reta (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) tangenciando a face distal dos segundos molares superiores (Figura 8).



Figura 8 – Porção anterior da maxila.

As peças foram armazenadas em frascos coletores individuais, previamente preparados e etiquetados, contendo 50 mL de solução de formoldeído a 10% e encaminhadas ao Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental (LMPE) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) da UNIT, onde foram processadas.

Os animais foram acondicionados em sacos plásticos identificados com símbolo de risco biológico e levados ao freezer (-20° C) onde permaneceram até a coleta do lixo realizada pela prefeitura (Coleta de Resíduos Infectantes), em carros especiais, e levados ao incinerador público.

3.8 Processamento histológico

As peças foram fixadas em solução de formoldeído a 10% por 7 dias e descalcificadas em solução de ácido nítrico a 5% pelo mesmo período, com trocas da solução a cada 48 horas. Após esse período, a hemimaxila direita, incluindo o incisivo reimplantado, foi separada da esquerda na linha mediana com o emprego de uma lâmina de bisturi número 20 (Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltda., Beiqiao Town, Suzhou City, China) (Figura 9), permanecendo em solução de ácido nítrico a 5% por mais 7 dias, com trocas da solução a cada 48 horas.



Figura 9 – Hemimaxila direita com o incisivo reimplantado.

Finalizada a descalcificação, as peças foram processadas histologicamente para inclusão em parafina e cortadas em secções histológicas longitudinais semisseriadas de 5 µm de espessura. As lâminas foram preparadas e submetidas a duas técnicas histoquímicas de coloração: hematoxilina-eosina (HE) e picrossirius red (PSR), sendo três lâminas com uma secção histológica alternada para cada técnica, perfazendo um total de seis lâminas por peça. A coloração HE foi realizada para observar áreas de reabsorção radicular, reabsorção radicular com substituição, perímetro com anquilose e reparo periodontal. PSR foi utilizado para visualização de fibras colágenas tipo I e III.

3.9 Análise histomorfométrica

O exame histológico foi realizado em microscopia de luz, utilizando o microscópio Olympus CX31 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), apenas na face palatina da raiz, pois o dente do rato apresenta cemento e ligamento periodontal apenas nessa face e em partes da

mesial e distal da raiz (Eccles *et al.*, 1964), e no terço médio, uma vez que essa região não é danificada pelos procedimentos cirúrgicos. Por outro lado, os terços cervical e apical podem ser danificados, respectivamente, pela ação do fórceps durante a extração e pela ação de corte da lâmina de bisturi durante a remoção da papila dental (dos Santos *et al.*, 2009). Imagens das secções histológicas longitudinais foram capturadas por meio de uma câmera digital (Olympus Camedia C-7070; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) acoplada ao microscópio com aumento original de 100x. Duas imagens (3072x2304 pixels) por secção foram feitas para representar o terço médio completo do periodonto palatino, sendo armazenadas em um microcomputador no formato JPEG.

O programa ImageJ 1.50b (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) foi utilizado para calcular áreas de reabsorção radicular, reabsorção com substituição, perímetro com anquilose e reparo periodontal, e áreas de deposição de colágeno tipo I e III. Áreas de reabsorção envolvendo dentina e preenchidas por tecido conjuntivo exibindo infiltrado celular inflamatório foram definidas como reabsorção radicular. Aquelas em que o tecido ósseo obliterou a área foram definidas como reabsorção com substituição (dos Santos *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2011). Anquilose foi definida como união direta de tecido ósseo com cimento intacto (Saito *et al.*, 2011). Reparo periodontal foi considerado quando observado cimento intacto recoberto por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas e fibroblastos (dos Santos *et al.*, 2009). Colágeno tipo I e III foram identificados como áreas com refringência amarela e verde, respectivamente, sob luz polarizada.

As secções histológicas foram analisadas de forma cega por único examinador previamente treinado. O cegamento foi realizado através de codificação numérica das peças, impossibilitando a identificação das mesmas em relação ao grupo e período experimental pelo examinador. Os valores de área e perímetro obtidos para cada tipo de reabsorção ou reparo foram calculados em relação à área total do terço médio do periodonto palatino e ao perímetro total do terço médio da superfície radicular palatina, respectivamente. Ou seja, foi considerada a área periodontal total e o perímetro radicular total projetados nas duas imagens obtidas por secção histológica representativas do terço médio do periodonto palatino.

3.10 Análise estatística

Todos os dados obtidos neste estudo foram tabulados em Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) e, em seguida, submetidos à análise de distribuição gaussiana

(normalidade) por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Uma vez que os dados apresentaram curva de distribuição gaussiana, diferenças significativas entre médias dos diferentes grupos foram analisadas utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparações múltiplas de *Tukey*. O nível de significância adotado nesses testes foi de 5%.

4 RESULTADOS

Este artigo segue as normas da revista Dental Traumatology, conforme Anexo 2.

Efeito da fotobiomodulação a laser de $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm no reparo periodontal de dentes reimplantados: análise histomorfométrica em ratos

Resumo

Objetivo: Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da fotobiomodulação a laser (FBML) de $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm e de meios de armazenamento no processo de reparo periodontal de reimplantes dentais em ratos. **Material e métodos:** Incisivos superiores direitos foram extraídos de sessenta ratos *Wistar* e distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n=10): GP, LI e LS, nos quais os dentes foram armazenados em guardanapo de papel, leite integral e leite de soja, respectivamente, por 45 minutos; e GPL, LIL e LSL, nos quais os dentes foram armazenados nos mesmos meios, mas a superfície radicular e o alvéolo foram tratados com FBML $\lambda 808$ nm antes do reimplante e a mucosa vestibular e palatina do alvéolo com FBML $\lambda 660$ nm após o reimplante. Cinco ratos de cada grupo foram eutanasiados em 15 ou 30 dias. A hemimaxila direita incluindo o incisivo reimplantado foi removida e processada para análise histomorfométrica de áreas de reabsorção radicular, reabsorção com substituição, perímetro com anquilose e reparo periodontal, e áreas de deposição de colágeno tipo I e III, utilizando o programa ImageJ 1.50b. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey* ($\alpha=5\%$). **Resultados:** LI e LS apresentaram menores áreas de reabsorção radicular e maior deposição de colágeno em ambos os períodos experimentais e LS o maior perímetro de reparo. A FBML reduziu a ocorrência de reabsorção radicular apenas no grupo GPL, tanto em 15 quanto em 30 dias, e aumentou o perímetro de reparo periodontal em todos os grupos em 30 dias. Houve maior deposição de colágeno nos grupos irradiados independente do período experimental. **Conclusão:** O protocolo de FBML de $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm, bem como leite integral e leite de soja favoreceram o processo de reparo periodontal de reimplantes dentais em ratos.

Introdução

Avulsão dental é uma lesão traumática complexa caracterizada pelo completo deslocamento do dente para fora do alvéolo, expondo-o ao ambiente externo e causando rompimento do feixe neurovascular e do ligamento periodontal (1). Sua ocorrência varia de 0,5 a 16% de todos os tipos de trauma dentoalveolar (2), com maior frequência em crianças com idade entre 7 e 12 anos, afetando, na maioria dos casos, incisivos centrais superiores (3). O tratamento de escolha nesses casos é o reimplante imediato do dente avulsionado em seu alvéolo, possibilitando, ainda que temporariamente, o restabelecimento da estética e da função (1).

Porém, na prática, raramente esse procedimento é realizado devido à complexidade do dano na área afetada, presença de lesões com risco iminente de morte ou devido à falta de conhecimento sobre os procedimentos de reimplante (1,4). Nessas situações, é recomendado que o dente seja armazenado em um meio capaz de manter a vitalidade das células do ligamento periodontal a fim de evitar ou minimizar futuras complicações como reabsorção radicular e anquilose, que são as maiores causas de insucesso de reimplantes dentais (5).

Vários experimentos (5–14) têm sido desenvolvidos com o objetivo de estabelecer um meio de armazenamento ideal, o qual deve apresentar, entre outros requisitos, pH e osmolaridade fisiologicamente compatíveis, substâncias nutricionais, disponibilidade e facilidade de acesso no local de um acidente (6). Solução Balanceada de Hanks (HBSS) e Viaspan[®], apesar de serem considerados os meios mais adequados por conterem todos os metabólitos essenciais para a manutenção celular, com taxas de sucesso de 90%, não são meios de armazenamento prontamente acessíveis e não estão disponíveis no mercado internacional (15,16). Por outro lado, leite bovino integral e, mais recentemente, leite de soja, têm sido amplamente recomendados como meios de armazenamento alternativos para dentes avulsionados por apresentarem eficácia clínica equivalente ao HBSS, com a vantagem de serem facilmente encontrados (5,6,9–11,13,14).

Nos últimos anos, considerando que mesmo respeitando as condições ideais de armazenamento o sucesso do reimplante é limitado, novas estratégias de tratamento, como a utilização da laserterapia, têm sido exploradas na tentativa de minimizar as complicações decorrentes do trauma e, conseqüentemente, manter o dente em função por um período mais longo (17–22). Apesar de já existirem relatos de que o laser melhora o processo de reparo periodontal em dentes reimplantados, reduzindo a ocorrência de reabsorção radicular e

anquilose (21,22), seus efeitos ainda são inconclusivos devido à escassez de trabalhos nessa linha de pesquisa, às diferenças nos parâmetros da laserterapia e devido ao grande número de variáveis que podem alterar a resposta dos tecidos biológicos.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de análise histomorfométrica, o efeito da fotobiomodulação a laser (FBML) associando dois comprimentos de onda (808 e 660 nm) no processo de reparo periodontal de reimplantes dentais em ratos, previamente armazenados em guardanapo de papel, leite bovino integral ou leite de soja por um período de 45 minutos. Essa investigação é de grande relevância porque protocolos de tratamento de dentes avulsionados utilizando meios de armazenamento acessíveis, como os que serão analisados neste estudo, associados à fotobiomodulação a laser, nunca foram testados anteriormente quanto ao seu potencial em reduzir a ocorrência de reabsorção radicular e favorecer o processo de reparo periodontal após o reimplante.

Material e Métodos

Modelo Experimental e Amostra

A pesquisa foi desenvolvida no modelo de estudo experimental *in vivo*, randomizado e com cegamento simples. O protocolo da pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o processo de número 041114. Sessenta ratos machos *Wistar* (*Rattus norvegicus*, albinus), pesando entre 200 e 250 g foram utilizados neste estudo. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (49x34x16 cm) com cinco animais em cada, sob condições padrões de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($55\pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12/12 h). Eles foram alimentados com ração sólida Labina[®] (Purina, São Paulo, SP, Brasil) e água *ad libitum*, com exceção das 12 horas pós-operatória.

Extração dental

Os ratos foram sedados e anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (Syntec do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil) e xilazina (Syntec do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil) na proporção de 0,75/0,5 ml e em uma dose de 0,1 ml por 100 g de peso corporal. Logo após, foi realizada a antisepsia intraoral da porção anterior da maxila com gluconato de clorexidina a 0,12% (Colgate-Palmolive Industrial Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil), seguida por sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito de cada rato, utilizando descolador de Buser (Trinity Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP,

Brasil) e fórceps de número 150 adaptado (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil).

Divisão dos grupos

Os dentes extraídos foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos ($n = 10$) de acordo com os seguintes tratamentos: grupo GP – os dentes foram armazenados em guardanapo de papel (Santher® - Fábrica de Papel Santa Therezinha S.A., Bragança Paulista, SP, Brasil); grupo GPL – os dentes receberam o mesmo tratamento descrito para GP, acrescido de FBML $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm; grupo LI – os dentes foram imersos em 20 ml de leite bovino UHT integral (Italac, Santa Helena de Goiás, GO, Brasil); grupo LIL – os dentes receberam o mesmo tratamento descrito para LI, acrescido de FBML $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm; grupo LS – os dentes foram imersos em 20 ml de leite de soja (Sollys Original, Nestlé, Araras, SP, Brasil); grupo LSL – os dentes receberam o mesmo tratamento descrito para LS, acrescido de FBML $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm. Todos os dentes foram mantidos em seus respectivos meios de armazenamento por um período de 45 minutos em temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

Tratamento do canal radicular

Após esse período, a papila dental de cada dente extraído foi removida com uma lâmina de bisturi número 15 (Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltda., Beiqiao Town, Suzhou City, China) e a polpa extirpada via forame apical com uma lima Hedstroem #20 de 25 mm pré-curvada (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) a fim de controlar o crescimento contínuo do incisivo dos ratos e evitar a necrose do tecido pulpar posterior à extração. Os canais radiculares foram irrigados com 5 ml de solução fisiológica (Farmax, Divinópolis, MG, Brasil), secos com pontas de papel absorvente (Dentsply Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) e preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (UltraCal® XS, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) utilizando capillary tips 25x0,35 mm (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA).

Reimplante dental

Antes do reimplante, realizou-se uma nova antissepsia da região anterior da maxila com gluconato de clorexidina a 0,12% e lavagem do alvéolo com 2 ml de solução fisiológica para a remoção do coágulo. Os grupos GPL, LIL e LSL foram tratados com FBML $\lambda 808$ nm e

λ660 nm de acordo com o protocolo descrito a seguir. Os dentes foram reimplantados em seus respectivos alvéolos com movimento lento e delicado utilizando uma pinça clínica (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil). Nenhum tipo de contenção foi utilizado, uma vez que a própria conformação anatômica do dente e de seu alvéolo é suficiente para mantê-lo em sua posição original (6,7,23).

Posteriormente, todos os animais receberam dose única intramuscular de uma associação antibiótica (Megacilin Super Plus[®], Vansil Ind. Com. e Repr. Ltda., Descalvado, SP, Brasil) diluída em 15 ml de água para injeção estéril (Samtec Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil), na posologia de 0,005 ml por 100 g de peso corporal. Esse procedimento foi realizado com o propósito de controlar a contaminação bacteriana da superfície dental exposta e evitar sua interferência na progressão da reabsorção radicular (7).

Protocolo da FBML

Nos grupos GPL, LIL e LSL, previamente ao reimplante, a superfície radicular mesial e distal de cada dente e o interior do alvéolo foram irradiados com laser diodo (Photon Lase III[®], DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil) de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl), emitido em um comprimento de onda de λ808 nm (luz infravermelha), de acordo com os seguintes parâmetros: modo de emissão contínuo (CW), potência de saída 100 mW, densidade de potência 3,6 W/cm², energia total por ponto 1,7 J e densidade de energia 61 J/cm². O laser foi aplicado de modo pontual e por contato na superfície radicular e na entrada do alvéolo com tempo total de exposição de 119 s: 17 s para cada terço cervical, médio e apical das faces proximais da raiz e 17 s para o interior do alvéolo.

Após o reimplante, as mucosas vestibular e palatina do alvéolo contendo o dente reimplantado foram irradiadas com laser diodo (Photon Lase III[®], DMC Equipamentos LTDA, São Carlos, SP, Brasil) de Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP), em comprimento de onda de 660 nm (luz visível), com os mesmos parâmetros descritos para o laser AsGaAl de λ808 nm, com exceção do tempo total de exposição que neste caso foi de 34 s: 17 s para a mucosa vestibular e 17 s para a palatina. Esse procedimento foi repetido em intervalos de 48 horas até completar cinco sessões de FBML λ660 nm. O dispositivo Photon Lase III[®] utilizado neste estudo para FBML antes e após o reimplante dental apresenta as seguintes características: diâmetro do ponto do feixe 1,9 mm, área do feixe de laser 0,028 cm², divergência do feixe perpendicular à junção 17° e ângulo da ponta 50°.

Eutanásia e processamento histológico

Cinco ratos de cada grupo foram eutanasiados 15 e 30 dias após o reimplante pelo método químico inalatório em câmara de gás de dióxido de carbono. A porção anterior da maxila foi removida por meio de um corte com uma tesoura de Metzembaun reta (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) tangenciando a face distal dos segundos molares. A maxila direita contendo o dente reimplantado foi separada da maxila esquerda na linha mediana utilizando uma lâmina de bisturi número 20 (Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltda., Beiqiao Town, Suzhou City, China). As peças foram fixadas em formoldeído a 10% por sete dias e descalcificadas em ácido nítrico a 5% por 14 dias, com trocas da solução a cada 48 horas.

Após isso, elas foram processadas histologicamente para inclusão em parafina e cortadas em secções histológicas longitudinais com 5 µm de espessura. Seis lâminas de microscópio, cada uma contendo uma secção histológica, foram preparadas por peça e submetidas a duas técnicas histoquímicas de coloração: hematoxilina-eosina (HE) e picrossirius red (PSR), totalizando três lâminas para cada técnica. A coloração HE foi realizada para observar áreas de reabsorção radicular, reabsorção radicular com substituição, perímetro com anquilose e reparo periodontal. PSR foi utilizado para visualização de fibras colágenas tipo I e III.

Análise Histomorfométrica

Imagens das secções histológicas longitudinais foram capturadas por meio de uma câmera digital (Olympus Camedia C-7070; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) acoplada a um microscópio (Olympus CX31; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) com aumento original de 100x. Apenas o terço médio da face palatina da raiz foi selecionado para análise porque essa região não é afetada pelos procedimentos cirúrgicos (6) e porque o dente do rato apresenta cemento e ligamento periodontal apenas nessa face e em partes da mesial e distal da raiz (24). Os terços cervical e apical, por outro lado, podem ser danificados pela ação do fórceps durante a extração e pela ação de corte da lâmina de bisturi durante a remoção da papila dental, respectivamente (6). Duas imagens (3072x2304 pixels) por secção foram feitas para representar o terço médio completo do periodonto palatino e foram armazenadas em um microcomputador no formato JPEG.

A análise histomorfométrica foi realizada de forma cega por único examinador previamente treinado. O programa ImageJ 1.50b (Wayne Rasband, National Institutes of

Health, USA) foi utilizado para calcular áreas de reabsorção radicular, reabsorção com substituição, perímetro com anquilose e reparo periodontal, e áreas de deposição de colágeno tipo I e III. Áreas de reabsorção envolvendo dentina e preenchidas por tecido conjuntivo exibindo infiltrado celular inflamatório foram definidas como reabsorção radicular. Aquelas em que o tecido ósseo obliterou a área foram definidas como reabsorção com substituição (6,20). Anquilose foi definida como união direta de tecido ósseo com cimento intacto (20). Reparo periodontal foi considerado quando observado cimento intacto recoberto por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas e fibroblastos (6). Colágeno tipo I e III foram identificados como áreas com refração amarela e verde, respectivamente, sob luz polarizada.

Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise de distribuição gaussiana (normalidade) por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Uma vez que os dados apresentaram curva de distribuição gaussiana, diferenças significativas entre médias dos diferentes grupos foram analisadas utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. O nível de significância adotado nesses testes foi de 5%.

Resultados

Neste estudo, foram analisadas áreas de reabsorção radicular, reabsorção com substituição, perímetro com anquilose, perímetro de reparo periodontal e áreas de deposição de colágeno tipo I e III, como demonstrado na Figura 1. Os resultados da análise histomorfométrica das secções histológicas e as comparações entre os grupos experimentais com relação à ocorrência de reabsorção radicular, reparo periodontal e deposição de colágeno em 15 e 30 dias estão descritos na Figura 2.

15 dias

Pequenas áreas de reabsorção radicular foram observadas em todos os grupos experimentais. Nenhum grupo apresentou reabsorção com substituição ou anquilose. O grupo GP mostrou significativamente maiores áreas de reabsorção radicular (Fig. 2a) e menor perímetro de reparo periodontal (Fig. 2b). LI e LS não apresentaram diferença significativa quanto à ocorrência de reabsorção radicular (Fig. 2a), porém LS proporcionou maiores valores de perímetro de reparo (Fig. 2b). A FBML diminuiu significativamente a ocorrência

de reabsorção radicular apenas no grupo GPL (Fig. 2a) e aumentou o perímetro de reparo periodontal nesse grupo e no grupo LSL (Fig. 2b), quando comparados grupos irradiados e não irradiados com o mesmo meio de armazenamento. A deposição de colágeno tipo I e III foi significativamente maior no grupo GP em relação aos grupos LI e LS que, por sua vez, apresentaram resultados estatisticamente semelhantes (Fig. 2c). Nos grupos irradiados com laser, houve maior deposição de colágeno tipo I e III em relação aos respectivos grupos não irradiados, com diferenças estatísticas significativas entre eles (Fig. 2c).

30 dias

Áreas de reabsorção radicular foram mais extensas neste período para todos os grupos experimentais. Reabsorção com substituição foi observada apenas nos grupos GP e GPL, com valores médios de 0,013 mm² e 0,005 mm², respectivamente. Anquilose esteve presente nos grupos GP, GPL, LI e LS, com valores médios de 0,227 mm, 0,075 mm, 0,041 mm e 0,036 mm para os respectivos grupos. Assim como observado no período de 15 dias, o grupo GP exibiu áreas significativamente maiores de reabsorção radicular (Fig. 2d) e menor perímetro de reparo periodontal (Fig. 2e). LI e LS não apresentaram diferença significativa quanto à ocorrência de reabsorção radicular (Fig. 2d), no entanto LS obteve os maiores valores de perímetro de reparo (Fig. 2e). A FBML diminuiu significativamente a ocorrência de reabsorção radicular apenas no grupo GPL (Fig. 2d) e aumentou o perímetro de reparo periodontal em todos os grupos irradiados (Fig. 2e). A deposição de colágeno tipo I e III foi significativamente maior nos grupos LI e LS quando comparados com o grupo GP, sem diferença estatística significativa entre LI e LS (Fig. 2f). Houve maior deposição de colágeno tipo I e III nos grupos irradiados com laser em relação aos respectivos grupos não irradiados, com diferenças estatísticas significativas entre eles (Fig. 2f).

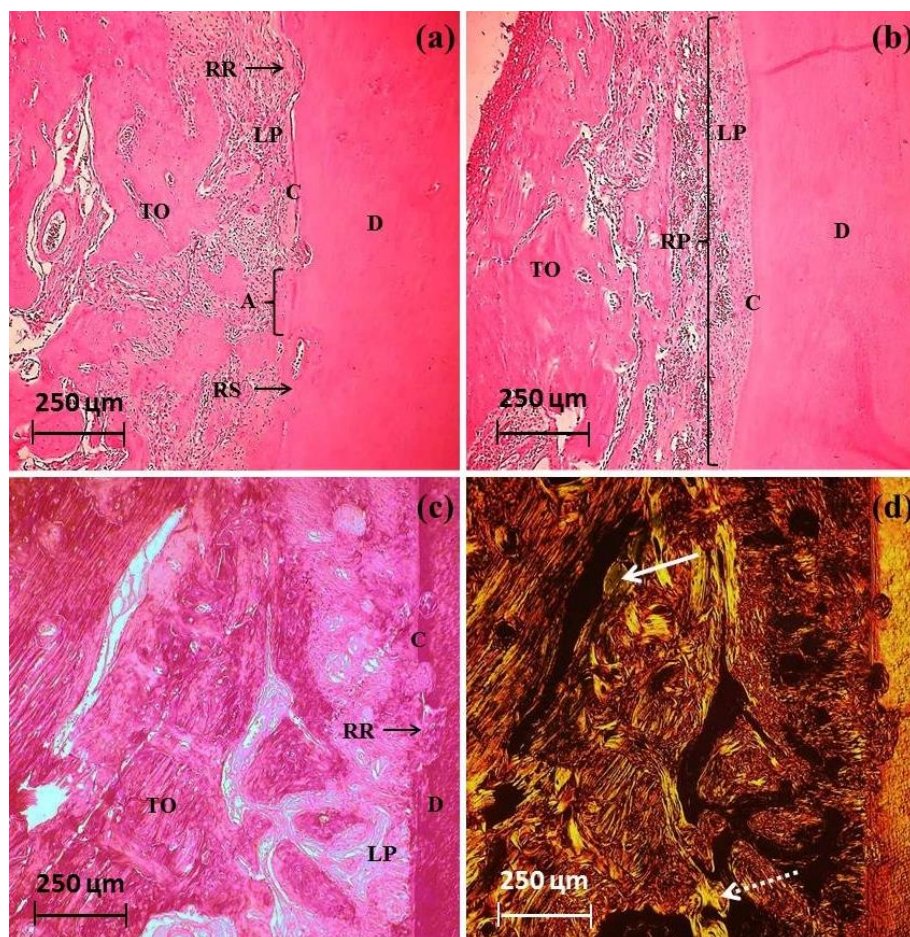


Fig. 1. (a) e (b) Fotomicrografias de secções histológicas longitudinais coradas com hematoxilina e eosina mostrando (a) áreas de reabsorção radicular (RR), reabsorção com substituição (RS), perímetro com anquilose (A) e (b) perímetro de reparo periodontal (RP). (c) Fotomicrografia de secção histológica corada com picrosirius red e mostrando (d) áreas de deposição de colágeno tipo I (áreas amarelas, seta pontilhada) e III (áreas verdes, seta contínua) em microscopia de luz polarizada. Dentina (D), cemento (C), ligamento periodontal (LP), tecido ósseo (TO). Aumento original 100x.

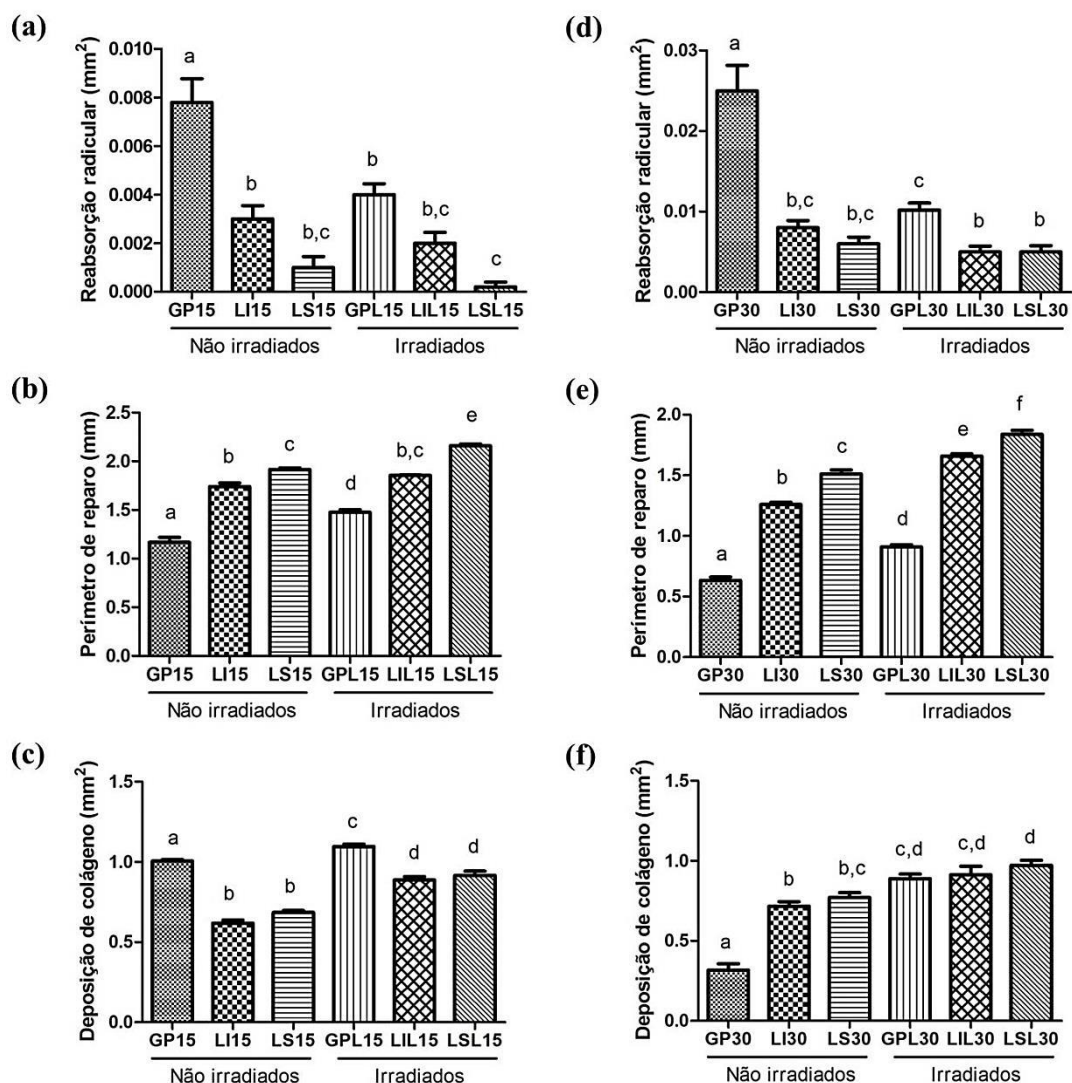


Fig. 2. Resultados da análise histomorfométrica de áreas de reabsorção radicular – (a) / (d), perímetro de reparo periodontal – (b) / (e), áreas de deposição de colágeno tipo I e III – (c) / (f) e comparações entre os grupos experimentais 15 dias – (a) / (b) / (c) e 30 dias – (d) / (e) / (f) após o reimplante. Dados expressos em média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA seguido por teste de Tukey. Barras com letras diferentes apresentam diferença estatística significativa entre si ($p < 0,05$).

Discussão

O sucesso do reimplante dental depende da regeneração do tecido conjuntivo periodontal, evitando assim perda progressiva de estrutura cimento-dentinária pela ocorrência de reabsorção radicular e anquilose (25). Nos últimos anos, um grande número de estudos experimentais *in vivo* (6–8,14,18,20–22) e *in vitro* (5,9–13,17,19) tem investigado diferentes protocolos de tratamento para dentes avulsionados na tentativa de evitar ou reduzir as complicações decorrentes do trauma. Métodos histomorfométricos de análise têm sido adotados pela maioria dos estudos *in vivo* e são considerados adequados para avaliar o

processo de reparo dos tecidos dentais e periodontais (6–8,14,20–22). Embora cães e macacos representem o modelo animal mais apropriado para estudos em traumatologia dental (26), ratos são mais utilizados devido à fácil manipulação e à existência de uma metodologia definida para reproduzir avulsão e reimplante. Além disso, esses animais possuem metabolismo mais acelerado, permitindo observar os mecanismos de reparo em um curto período de tempo (6,7,20–22).

No que se refere ao tempo de armazenamento extra-alveolar dos dentes, estudos anteriores têm utilizado intervalos de 15 minutos (22), 30 minutos (20), 45 minutos (20) ou 60 minutos (6,21). Na atual investigação, os dentes foram mantidos em seus respectivos meios durante 45 minutos porque ficou demonstrado que células do ligamento periodontal cementário permanecem viáveis dentro desse período (10,20). As soluções de armazenamento foram utilizadas em temperatura ambiente (22°C) para reproduzir a condição mais provável, uma vez que leite refrigerado nem sempre está disponível no local do acidente, apesar de ser conhecido que a temperatura ideal nesses casos deve ser próxima de 4°C (5,8,27,28). Os animais foram eutanasiados em 15 e 30 dias após o reimplante, pois é sabido que esse período é suficiente para observar os processos inflamatório e de reparo (7,21,22), já que o reparo do ligamento periodontal ocorre entre 2 e 4 semanas após o reimplante (29,30).

Guardanapo de papel foi utilizado como controle negativo simulando uma situação comum observada na prática clínica com relação ao meio de armazenamento de dentes avulsionados (31–33). Os resultados desta pesquisa revelaram que os dentes armazenados em guardanapo de papel apresentaram as maiores áreas de reabsorção radicular e o menor perímetro de reparo periodontal em 15 e 30 dias após o reimplante. Além disso, reabsorção com substituição e anquilose foram mais frequentes nesse grupo. Esse desfecho já era esperado uma vez que o guardanapo de papel não oferece qualquer benefício para manutenção da vitalidade das células do ligamento periodontal e porque apresenta maior risco de contaminação bacteriana. Isso confirma o pressuposto de que o reparo do ligamento periodontal depende da existência de células remanescentes viáveis, neste caso fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos e células de defesa (34). Outros trabalhos utilizaram gaze (22) ou exposição ao ambiente (6,7,18) como controle negativo e observaram que o armazenamento a seco é deletério para o dente avulsionado, o que está de acordo com os achados deste experimento.

O presente estudo avaliou o reparo periodontal de dentes armazenados em leite bovino integral e leite de soja devido à acessibilidade e disponibilidade desses produtos no cenário de

um acidente. Ambas as soluções apresentaram resultados similares quanto à ocorrência de reabsorção radicular e anquilose nos dois períodos experimentais, porém o leite de soja proporcionou melhores condições para o processo de reparo periodontal. Leite bovino integral tem sido considerado um meio de armazenamento adequado para dentes avulsionados, equivalente à Solução Balanceada de Hanks (HBSS) (5,6,10,11,14,35), por apresentar pH (36) e osmolaridade (37) fisiologicamente compatíveis, alguns nutrientes (38) e fatores de crescimento (39). Com relação ao leite de soja, Silva et al. (11), em um estudo *in vitro* para determinar a viabilidade de fibroblastos incubados em diferentes meios, demonstraram que essa solução tem eficácia similar ao HBSS e ao leite integral, podendo preservar a vitalidade celular por até 24 horas. Leite de soja é rico em proteínas de alta qualidade, vitaminas e sais minerais essenciais para a nutrição celular, não contém colesterol ou lactose, possui baixo teor de gordura saturada, ao contrário do leite integral, e é um excelente meio de cultura para o crescimento celular e atividades bioquímicas (9,40,41), justificando os resultados da atual pesquisa.

O protocolo de fotobiomodulação a laser utilizado neste experimento foi selecionado com base no tecido-alvo, isto é, tecido conjuntivo periodontal, e nos achados de pesquisas que observaram melhora no processo de reparo de dentes reimplantados em ratos quando da irradiação da superfície radicular com laser AsGaAl no espectro infravermelho (comprimentos de onda entre 780 e 950 nm) e da superfície radicular, interior do alvéolo e mucosa circunjacente ao rebordo alveolar com laser InGaAlP no espectro vermelho (comprimentos de onda entre 600 e 700 nm) (21,22). Adicionalmente, alguns estudos tem reportado que a combinação de lasers vermelho e infravermelho é mais eficaz em reduzir o processo inflamatório e acelerar o processo de reparo tecidual (42,43). Assim, este estudo utilizou laser AsGaAl λ 808 nm para irradiação do ligamento periodontal remanescente aderido à superfície radicular e parede alveolar interna e laser InGaAlP λ 660 nm para irradiação da mucosa vestibular e palatina do alvéolo após o reimplante, visando potencializar os efeitos bioestimulatórios dos dois comprimentos de onda sobre o processo de reparo periodontal.

Os resultados obtidos demonstraram que a FBML λ 808 nm e λ 660 nm aumentou significativamente o perímetro de reparo periodontal em todos os grupos irradiados, quando avaliados 30 dias após o reimplante, mas não impediu a ocorrência de reabsorção radicular. No período experimental de 15 dias, o laser não melhorou significativamente o reparo apenas no grupo em que foi utilizado o leite integral como meio de armazenamento, talvez porque

esse tempo não tenha sido suficiente para se observar os efeitos bioestimulatórios do tratamento nesse grupo, os quais se tornaram evidentes apenas quando analisados 30 dias após o reimplante. A FBML reduziu a ocorrência de reabsorção radicular em todos os grupos irradiados, porém essa redução só foi estatisticamente significativa quando se utilizou o guardanapo de papel como meio de armazenamento, corroborando o pressuposto de que seus efeitos são mais evidentes quando a função celular está subótima (44). Ademais, nenhum dos grupos tratados com FBML apresentou reabsorção com substituição ou anquilose, com exceção daquele em que foi utilizado guardanapo de papel como meio de armazenamento, provavelmente devido à presença de menor número de células do ligamento periodontal viáveis no momento da fotoativação, gerando maior estimulação de células ósseas (20).

De acordo com estudos prévios (20–22), tais resultados podem ser atribuídos às propriedades fotobiomoduladoras do laser, como estimulação da proliferação celular (45) e vascular (46), redução do número de células inflamatórias (47,48), inibição da síntese de ciclooxigenase-2 e citocinas pró-inflamatórias (49,50), as quais promovem efeitos analgésicos (46) e anti-inflamatórios (51) e favorecem o processo de reparo tecidual (18,52). Quanto a sua ação sobre as células do tecido conjuntivo periodontal, o laser estimula a proliferação de fibroblastos, osteoblastos, macrófagos e linfócitos (45), justificando o acelerado processo de reparo desse tecido. Além do efeito anti-inflamatório que desacelera o processo de reabsorção (22), tem sido relatado que o laser produz alterações morfológicas na superfície radicular que a torna mais resistente à ação das células clásticas (21), sem alterar sua biocompatibilidade ou provocar danos térmicos (17), favorecendo adicionalmente a adesão dos fibroblastos do ligamento periodontal à raiz (53,54). Esses achados, juntamente com os efeitos bactericidas atribuídos ao laser (55,56), criam novas perspectivas para o tratamento de dentes avulsionados e reimplantados com uso da laserterapia.

Em pesquisa realizada dos últimos cinco anos, foram encontrados apenas três artigos que avaliaram os efeitos do laser sobre o processo de reparo após reimplante dental em ratos (20–22). Apesar de apresentarem diferenças metodológicas, os achados do presente estudo corroboram aqueles encontrados nos trabalhos de Carvalho et al. (21) e Vilela et al. (22). O primeiro avaliou, por meio de análise radiográfica e histomorfométrica, os efeitos da irradiação laser AsGaAl λ 810 nm na superfície radicular de dentes reimplantados em ratos e observou que o tratamento favoreceu o processo de reparo, reduzindo a incidência de reabsorção radicular (21). O segundo realizou uma análise histológica do ligamento dental e periodontal de reimplantes dentais em ratos previamente irradiados com laser InGaAlP λ 685

nm na superfície radicular, no interior do alvéolo e na mucosa alveolar, e constatou menores áreas de reabsorção radicular, necrose e células inflamatórias. No entanto, Saito et al. (20), em uma análise histológica e imuno-histoquímica, não observaram melhora significativa no processo de reparo periodontal quando da aplicação do laser AsGaAl λ 660 nm na superfície radicular e λ 830 nm na ferida alveolar previamente ao reimplante. Essa divergência provavelmente se deve às diferenças nos parâmetros da laserterapia, especialmente no que se refere ao comprimento de onda, potência de saída, modo de emissão e aplicação, número de aplicações, energia, tempo de irradiação e densidade de energia (57).

A análise da deposição de colágeno revelou que, nos grupos tratados com FBML λ 808 e λ 660 nm, houve um aumento significativo de colágeno tipo I e III no tecido conjuntivo adjacente à superfície radicular palatina, sugerindo que esse protocolo de tratamento favorece a fibroplasia, acelerando a dinâmica de collagenização, o que configura um processo de reparo mais favorável. Esse efeito também foi observado em outros trabalhos que avaliaram o processo de cicatrização de feridas em ratos (42,43,58) e está associado a uma ação direta do laser sobre o metabolismo de fibroblastos e síntese de colágeno (59). Leite integral e leite de soja favoreceram o aumento na deposição de colágeno tipo I e III com o passar do tempo até 30 dias, provavelmente porque esses meios mantiveram maior número de fibroblastos viáveis durante o período de armazenamento extra-alveolar em relação ao guardanapo de papel. A deposição significativamente menor de colágeno nos grupos não irradiados pode também ser resultante da ativação de enzimas degradadoras de colágeno como as metaloproteinases, que são liberadas pela maior quantidade de neutrófilos polimorfonucleares inflamatórios provavelmente presente nesses grupos (60). Essa análise adicional é fundamentada no processo de reparo tecidual que envolve uma série de eventos biológicos, iniciando com hemostasia e seguindo com inflamação, proliferação e remodelação ou cicatrização, de maneira que uma menor quantidade de fibroblastos e, conseqüentemente, síntese de colágeno na fase proliferativa determina uma qualidade pobre de reparo (58,61). Portanto, o estudo da deposição de colágeno tipo I (maduro) e III (imaturo) é de grande relevância quando se deseja avaliar o processo de reparo tecidual, justificando sua inclusão neste trabalho.

Em conclusão, foi demonstrado neste experimento que o leite bovino integral e o leite de soja são meios adequados para armazenamento de dentes avulsionados, pois apresentaram resultados similares para a maioria das variáveis analisadas no processo de reparo periodontal, isto é, reabsorção radicular, reabsorção com substituição, anquilose e deposição de colágeno tipo I e III. A fotobiomodulação a laser λ 808 nm na superfície radicular e no interior do

alvéolo previamente ao reimplante e $\lambda 660$ nm na mucosa vestibular e palatina do alvéolo após o reimplante favoreceu o processo de reparo periodontal reduzindo a ocorrência de reabsorção radicular e/ou aumentando o perímetro de reparo e a deposição de colágeno tipo I e III. Novos estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando meios de armazenamento acessíveis e tempos experimentais mais longos, associados ou não a fotobiomodulação a laser com diferentes parâmetros, são necessários para o estabelecimento de protocolos de tratamento de dentes avulsionados adequados para uso clínico. Os efeitos do laser sobre o processo de reparo em reimplantes dentais precisam ser mais precisamente compreendidos devido ao grande número de variáveis que podem alterar a resposta dos tecidos biológicos, a fim de justificar o emprego clínico desse recurso terapêutico.

Referências

1. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2012;28(2):88–96.
2. Baginska J, Wilczynska-Borawska M. First-aid algorithms in dental avulsion. *J Sch Nurs.* 2012;28(2):90–4.
3. Cavalcanti AL, Bezerra PKM, de Alencar CRB, Moura C. Traumatic anterior dental injuries in 7- to 12-year-old Brazilian children. *Dent Traumatol.* 2009;25(2):198–202.
4. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol.* 1995;11:76–89.
5. Souza BDM, Lückemeyer DD, Reyes-Carmona JF, Felipe WT, Simões CMO, Felipe MCS. Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconut water as storage media. *Int Endod J.* 2011;44(2):111–5.
6. dos Santos CLV, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundfeld MLMM, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol.* 2009;25(1):51–7.
7. Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, Moraes IGD, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. *Dent Traumatol.* 2010;26(1):80–5.

8. Sottovia AD, Sottovia Filho D, Poi WR, Panzarini SR, Luize DS, Sonoda CK. Tooth replantation after use of Euro-Collins solution or bovine milk as storage medium: a histomorphometric analysis in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(1):111–9.
9. Moazami F, Mirhadi H, Geramizadeh B, Sahebi S. Comparison of soymilk, powdered milk, Hank's balanced salt solution and tap water on periodontal ligament cell survival. *Dent Traumatol.* 2012;28(2):132–5.
10. Moura CCG, Soares PBF, Reis MVDP, Fernandes Neto AJ, Soares CJ. Soy milk as a storage medium to preserve human fibroblast cell viability: an in vitro study. *Braz Dent J.* 2012;23(5):559–63.
11. Silva EJNL, Rollemberg CB, Coutinho-Filho TS, Krebs RL, Zaia AA. Use of soymilk as a storage medium for avulsed teeth. *Acta Odontol Scand.* 2013;71:1101–4.
12. Wang WJ, Zhao YM, Feng XY, Jia WQ, Ge LH. Effect of skimmed pasteurized milk and Hank's balanced salt solution on viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Dent Traumatol.* 2013;29(5):365–71.
13. Moura CCG, Soares PBF, de Paula Reis MV, Fernandes Neto AJ, Zanetta Barbosa D, Soares CJ. Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an in vitro study. *Dent Traumatol.* 2014;30(1):22–6.
14. Reis MVP, Moura CCG, Soares PBF, Leoni GB, Souza-Neto MD, Barbosa DZ, et al. Histologic and micro-computed tomographic analyses of replanted teeth stored in different kind of media. *J Endod.* 2014;40(5):665–9.
15. Udoeye CI, Jafarzadeh H, Abbott PV. Transport media for avulsed teeth: a review. *Aust Endod J.* 2012;38(3):129–36.
16. Malhotra N. Current developments in interim transport (storage) media in dentistry: an update. *Br Dent J.* 2011;211(1):29–33.
17. Haypek P, Zezell DM, Bachmann L, Marques MM. Interaction between high-power diode laser and dental root surface. Thermal, morphological and biocompatibility analysis. *J Oral Laser Appl.* 2006;6(2):101–9.
18. Hamaoka L, Moura-Netto C, Marques MM, de Moura AAM. Nd:YAG laser improves biocompatibility of human dental root surfaces. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(5):715–20.
19. Choi EJ, Yim JY, Koo KT, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, et al. Biological effects of a semiconductor diode laser on human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal*

- Implant Sci. 2010;40(3):105–10.
20. Saito CTMH, Gulinelli JL, Panzarini SR, Garcia VG, Okamoto R, Okamoto T, et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. *Dent Traumatol.* 2011;27(1):30–9.
 21. Carvalho EDS, Costa FTS, Campos MS, Anbinder AL, Neves ACC, Habitante SM, et al. Root surface treatment using diode laser in delayed tooth replantation: radiographic and histomorphometric analyses in rats. *Dent Traumatol.* 2012;28(6):429–36.
 22. Vilela RG, Gjerde K, Frigo L, Leal ECP, Lopes-Martins RAB, Kleine BM, et al. Histomorphometric analysis of inflammatory response and necrosis in re-implanted central incisor of rats treated with low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2012;27(3):551–7.
 23. Ricieri CB, Sonoda CK, Aranega AM, Panzarini SR, Poi WR, Sundefeld MLMM, et al. Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol.* 2009;25(3):284–9.
 24. Eccles JD. The development of the periodontal membrane in the rat incisor. *Arch Oral Biol.* 1964;9(2):127–33.
 25. Mine K, Kanno Z, Muramoto T, Soma K. Occlusal forces promote periodontal healing of transplanted teeth and prevent dentoalveolar ankylosis: an experimental study in rats. *Angle Orthod.* 2005;75(4):637–44.
 26. Andreasen JO, Andersson L. Critical considerations when planning experimental in vivo studies in dental traumatology. *Dent Traumatol.* 2011;27(4):275–80.
 27. Lekic PC, Moe HK, Barrett EJ, McCulloch CAG. Relationship of clonogenic capacity to plating efficiency and vital dye staining of human periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *J Period Res.* 1996;31(4):294–300.
 28. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol.* 2011;27(4):281–94.
 29. Mandel U, Viidik A. Effect of splinting on the mechanical and histological properties of the healing periodontal ligament in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Arch Oral Biol.* 1989;34(3):209–17.
 30. Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE, et al. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol.* 2013;29(1):15–

22.

31. Mori GG, Turcio KHL, Borro VPB, Mariusso AM. Evaluation of the knowledge of tooth avulsion of school professionals from Adamantina, São Paulo, Brazil. *Dent Traumatol.* 2007;23(1):2–5.
32. Mori GG, Janjácomo DMM, Castilho LR, Poi WR. Evaluating the knowledge of sports participants regarding dental emergency procedures. *Dent Traumatol.* 2009;25(3):305–8.
33. Hiremath G, Kidiyoor KH. Avulsion and storage media. *J Investig Clin Dent.* 2011;2(2):89–94.
34. Andreasen JO. Relationship between cell damage in the periodontal ligament after replantation and subsequent development of root resorption. *Acta Odontol Scand.* 1981;39:15–25.
35. de Souza BDM, Bortoluzzi EA, Teixeira CS, Felipe WT, Simões CMO, Felipe MCS. Effect of HBSS storage time on human periodontal ligament fibroblast viability. *Dent Traumatol.* 2010;26(6):481–3.
36. Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE, Opperman LA. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dent Traumatol.* 2004;20(3):21–8.
37. Lindskog S, Blomlof L. Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. *Dent Traumatol.* 1982;40:435–41.
38. Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. *Endod Dent Traumatol.* 1999;15:149–56.
39. Pearson RM, Liewehr FR, West LA, Patton WR, McPherson JC, Runner RR. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. *J Endod.* 2003;29:184–6.
40. Wang YC, Yu RC, Chou CC. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiol.* 2002;19:501–8.
41. Ng KH, Lye HS, Easa AM, Liong MT. Growth characteristics and bioactivity of probiotics in tofu-based medium during storage. *Ann Microbiol.* 2008;58(3):477–87.
42. Santos NRS, Sobrinho JBM, Almeida PF, Ribeiro AA, Cangussú MCT, Santos JN, et al. Influence of the combination of infrared and red laser light on the healing of

- cutaneous wounds infected by *Staphylococcus aureus*. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(3):177–82.
43. Marinho RR, Matos RM, Santos JS, Ribeiro MAG, Smaniotto S, Barreto EO, et al. Potentiated anti-inflammatory effect of combined 780 nm and 660 nm low level laser therapy on the experimental laryngitis. *J Photochem Photobiol B*. 2013;121:86–93.
 44. Pinheiro ALB, Brugnera JRA, Zanin FAA. *Aplicação do Laser na Odontologia*. 2010. 428 p.
 45. Chen CH, Hung HS, Hsu SH. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers Surg Med*. 2008;40(1):46–54.
 46. Schindl L, Schindl M, Polo L, Jori G, Perl S, Schindl A. Effects of low power laser-irradiation on differential blood count and body temperature in endotoxin-preimmunized rabbits. *Life Sci*. 1997;60(19):1669–77.
 47. Paiva-Oliveira EL, Lima NC, Silva PH, Sousa NTA, Barbosa FS, Orsini M. Low-level laser therapy (LLLT) reduces inflammatory infiltrate and enhances skeletal muscle repair: histomorphometric parameters. *Laser Phys*. 2012;22(9):1425–30.
 48. Matos FS, Soares AF, Albuquerque Júnior RLC, Ribeiro SO, Lima GDN, Novais SMA, et al. Effect of laser therapy on the inflammatory response induced by endodontic medications implanted into the subcutaneous tissue of rats. *Rev Odontol da UNESP*. 2014;43(5):343–50.
 49. Sakurai Y, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2000;108(1):29–34.
 50. Esteves I, Masson IB, Oshima CTF, Paiotti APR, Liebano RE, Plapler H. Low-level laser irradiation, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and necrosis of random skin flaps in rats. *Lasers Med Sci*. 2012;27(3):655–60.
 51. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MAC, Bjordal JM, Alves LP, et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2007;89:50–5.
 52. Ribeiro MAG, Albuquerque-Júnior RLC, Barreto ALS, Oliveira VGAM, Santos TB, Dantas CDF. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² λ 660-nm laser irradiation. *Indian J Dent Res*. 2009;20(3):390.

53. Hakki SS, Korkusuz P, Berk G, Dundar N, Saglam M, Bozkurt B, et al. Comparison of Er,Cr:YSGG laser and hand instrumentation on the attachment of periodontal ligament fibroblasts to periodontally diseased root surfaces: an in vitro study. *J Periodontol*. 2010;81(8):1216–25.
54. Raldi DP, Mello I, Neves ACC, Habitante SM, Miyagi SSP, Lage-Marques JL. Attachment of cultured fibroblasts and ultrastructural analysis of simulated cervical resorptions treated with high-power lasers and MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(2):e154–61.
55. Kreisler M, Kohnen W, Beck M, Al Haj H, Christoffers AB, Götz H, et al. Efficacy of NaOCl/H₂O₂ irrigation and GaAlAs laser in decontamination of root canals in vitro. *Lasers Surg Med*. 2003;32(3):189–96.
56. de Souza EB, Cai S, Simionato MRL, Lage-Marques JL. High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(1):e68–72.
57. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004;69(1):81–90.
58. Lau P, Bidin N, Krishnan G, Anaybaleg SM, Sum MBM, Bakhtiar H, et al. Photobiostimulation effect on diabetic wound at different power density of near infrared laser. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2015;151:201–7.
59. Pugliese LS. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(4):307–13.
60. Kessenbrock K, Brown M, Werb Z. Measuring matrix metalloproteinase activity in macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *Curr Protoc Immunol*. 2011;14:14–24.
61. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009;37(5):1528–42.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo de fotobiomodulação a laser de $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm favoreceu o processo de reparo periodontal de reimplantes dentais em ratos, reduzindo a ocorrência de reabsorção radicular e/ou aumentando o perímetro de reparo e a deposição de colágeno tipo I e III.

Leite bovino integral e leite de soja apresentaram resultados similares para a maioria das variáveis analisadas no processo de reparo periodontal, isto é, reabsorção radicular, reabsorção com substituição, anquilose e deposição de colágeno tipo I e III, e podem, assim, ser utilizados como meios de armazenamento para dentes avulsionados.

Guardanapo de papel promoveu resultados desfavoráveis quanto à ocorrência de reabsorção radicular, reabsorção com substituição, anquilose, reparo periodontal e deposição de colágeno tipo I e III e, portanto, deve ser evitada a sua utilização para armazenamento de dentes avulsionados.

6 COMUNICADO DE IMPRENSA (*PRESS RELEASE*)

LASERTERAPIA E MEIOS DE ARMAZENAMENTO ACESSÍVEIS PODEM MELHORAR O PROGNÓSTICO DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO

Avulsão dental é uma lesão traumática complexa caracterizada pelo completo deslocamento do dente para fora do alvéolo. Sua ocorrência varia de 0,5 a 16% de todos os tipos de trauma que acometem os dentes e os tecidos de suporte como o osso alveolar e ocorre com maior frequência em crianças com idade entre 7 e 12 anos. O reimplante imediato do dente é considerado o tratamento ideal para esse tipo de acidente, porém ele raramente é realizado. A estratégia terapêutica para melhorar o prognóstico desses casos, inibindo principalmente a ocorrência de reabsorção radicular externa, parece estar relacionada à estimulação da regeneração do tecido conjuntivo periodontal. Nossos resultados, utilizando um modelo animal, sugerem que, dentro dos parâmetros do estudo, o protocolo de tratamento utilizando leite bovino integral ou leite de soja como meios de armazenamento do dente por até 45 minutos associado à fotobiomodulação a laser de $\lambda 808$ nm e $\lambda 660$ nm, antes e após o reimplante, melhora o processo de reparo periodontal de reimplantes dentais, beneficiando o prognóstico dos mesmos. Embora ainda sejam necessários estudos clínicos para validar esses mesmos efeitos no homem, os resultados são promissores e abrem caminho para novos estudos envolvendo lasers e para o desenvolvimento de outros protocolos de tratamento de dentes avulsionados adequados para uso clínico.

Contatos: Felipe de Souza Matos (felipe_smatos@hotmail.com) e Maria Amália Gonzaga Ribeiro (endoribeiro@yahoo.com.br). Universidade Federal de Sergipe, Hospital Universitário, Departamento de Odontologia. Rua Cláudio Batista, s/n. Bairro Sanatório. Aracaju, Sergipe, Brasil. CEP: 49060-100.

REFERÊNCIAS

Almeida-Lopes L, Lopes A. Técnica da drenagem linfática ativada por laserterapia. In: Dib LL, Saddy MS (Org.). Atualização Clínica em Odontologia. São Paulo: Artes Médicas, 2006. cap. 14.

Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. Dent Traumatol. 2012;28(2):88-96.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. Endod Dent Traumatol. 1995;11:76–89.

Baginska J, Wilczynska-Borawska M. First-aid algorithms in dental avulsion. J Sch Nurs. 2012;28(2):90-94.

Carvalho EDS, Costa FTS, Campos MS, Anbinder AL, Neves ACC, Habitante SM, et al. Root surface treatment using diode laser in delayed tooth replantation: radiographic and histomorphometric analyses in rats. Dent Traumatol. 2012;28(6):429–36.

Choi EJ, Yim JY, Koo KT, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, et al. Biological effects of a semiconductor diode laser on human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Implant Sci. 2010;40(3):105–10.

dos Santos CLV, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld MLMM, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. Dent Traumatol. 2009;25(1):51–7.

Duarte DA, Bonecker MS, Santana GR, Suga SS. Caderno de odontopediatria. Lesões traumáticas em dentes decíduos: tratamento e controle. São Paulo: Santos, 2001. 145p.

Eccles JD. The development of the periodontal membrane in the rat incisor. *Arch Oral Biol.* 1964;9(2):127–33.

Hamaoka L, Moura-Netto C, Marques MM, de Moura AAM. Nd:YAG laser improves biocompatibility of human dental root surfaces. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(5):715–20.

Haypek P, Zezell DM, Bachmann L, Marques MM. Interaction between high-power diode laser and dental root surface. Thermal, morphological and biocompatibility analysis. *J Oral Laser Appl.* 2006;6(2):101–9.

Hecova H, Tzigkounakis V, Merglova V, Netolicky J. A retrospective study of 889 injured permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2010;26(6):466-475.

Malhotra N. Current developments in interim transport (storage) media in dentistry: an update. *Br Dent J.* 2011;211(1):29-33.

Moazami F, Mirhadi H, Geramizadeh B, Sahebi S. Comparison of soymilk, powdered milk, Hank's balanced salt solution and tap water on periodontal ligament cell survival. *Dent Traumatol.* 2012;28(2):132–5.

Mori GG, Garcia RB, de Moraes IG, Bramante CM, Bernardineli N. Morphometric and microscopic evaluation of the effect of a solution of alendronate as an intracanal therapeutic agent in rat teeth submitted to late reimplantation. *Dent Traumatol.* 2007;23(4):218-221.

Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, Moraes IGD, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. *Dent Traumatol.* 2010;26(1):80–5.

Moura CCG, Soares PBF, Reis MVDP, Fernandes Neto AJ, Zanetta Barbosa D, Soares CJ. Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an in vitro study. *Dent Traumatol.* 2014;30(1):22–6.

Moura CCG, Soares PBF, Reis MVDP, Fernandes Neto AJ, Soares CJ. Soy milk as a storage

medium to preserve human fibroblast cell viability: an in vitro study. *Braz Dent J*. 2012;23(5):559–63.

Petrovic B, Markovic D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol*. 2010;26(1):52-59.

Reis MVP, Moura CCG, Soares PBF, Leoni GB, Souza-Neto MD, Barbosa DZ, et al. Histologic and micro-computed tomographic analyses of replanted teeth stored in different kind of media. *J Endod*. 2014;40(5):665–9.

Ricieri CB, Sonoda CK, Aranega AM, Panzarini SR, Poi WR, Sundefeld MLMM, et al. Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol*. 2009;25(3):284–9.

Rocha Júnior AM, Vieira BJ, Andrade LCF, Monteiro A. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2007;6:258-266.

Saito CTMH, Gulinelli JL, Panzarini SR, Garcia VG, Okamoto R, Okamoto T, et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. *Dent Traumatol*. 2011;27(1):30–9.

Silva EJNL, Rollemberg CB, Coutinho-Filho TS, Krebs RL, Zaia AA. Use of soymilk as a storage medium for avulsed teeth. *Acta Odontol Scand*. 2013;71:1101–4.

Sottovia AD, Sottovia Filho D, Poi WR, Panzarini SR, Luize DS, Sonoda CK. Tooth replantation after use of Euro-Collins solution or bovine milk as storage medium: a histomorphometric analysis in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(1):111–9.

Souza BDM, Lückemeyer DD, Reyes-Carmona JF, Felipe WT, Simões CMO, Felipe MCS. Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconut water as storage media. *Int Endod J*. 2011;44(2):111–5.

Udoyce CI, Jafarzadeh H, Abbott PV. Transport media for avulsed teeth: a review. Aust Endod J. 2012;38(3):129-136.

Vilela RG, Gjerde K, Frigo L, Leal ECP, Lopes-Martins RAB, Kleine BM, et al. Histomorphometric analysis of inflammatory response and necrosis in re-implanted central incisor of rats treated with low-level laser therapy. Lasers Med Sci. 2012;27(3):551-557.

Wang WJ, Zhao YM, Feng XY, Jia WQ, Ge LH. Effect of skimmed pasteurized milk and Hank's balanced salt solution on viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Dent Traumatol. 2013;29(5):365–71.

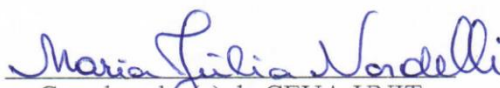
ANEXO 1



UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto de pesquisa, “Efeito da fotobiomodulação a laser 780 e 660nm e de soluções de armazenamento no processo de reparo periodontal de reimplantes dentários em ratos”, processo nº 041114, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pelo pesquisador **Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior**, onde recebeu o parecer de **Aprovado**, dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 11 de dezembro de 2014.


Coordenador(a) da CEUA-UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
Prof.^a Maria Júlia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

ANEXO 2

Author Guidelines

1. GENERAL

Dental Traumatology is an international journal which aims to convey scientific and clinical progress in all areas related to adult and pediatric dental traumatology. It aims to promote communication among clinicians, educators, researchers, administrators and others interested in dental traumatology. The journal publishes original scientific articles, review articles in the form of comprehensive reviews or mini reviews of a smaller area, short communication about clinical methods and techniques and case reports. The journal focuses on the following areas related to dental trauma:

Epidemiology and Social Aspects

Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations

Pediatrics and Orthodontics

Oral and Maxillofacial Surgery / Transplants / Implants

Esthetics / Restorations / Prosthetics

Prevention and Sports Dentistry

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Dental Traumatology*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Dental Traumatology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

Dental Traumatology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements on the title page.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. The acknowledgements should be placed on the title page, not the main document, to allow blinded review.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration (version, 2008 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. In the online submission process we also require that all authors submitting manuscripts to *Dental Traumatology* online

must answer in the affirmative to a statement 'confirming that all research has been carried out in accordance with legal requirements of the study country such as approval of ethical committees for human and/or animal research or other legislation where applicable.' Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest

Dental Traumatology requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. The Conflict of Interest Statement should be included within the title page, not the main document, to allow blinded review.

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.7 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.8 Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs.

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Wiley-Blackwell if and when the

manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the copyright to publish their paper to Wiley-Blackwell. Assignment of the copyright is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed. A completed Copyright Transfer Agreement must be completed online before any manuscript can be published upon receiving notice of manuscript acceptance.

Sheryl Acorda

Production Editor

John Wiley & Sons Singapore Pte Ltd

Email: edt@wiley.com

2.9 OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/dt>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Office: Justine Casas EDToffice@wiley.com.

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/dt>
- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/dt> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre.'

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files. Please upload:
 - Your manuscript without title page under the file designation 'main document'.
 - Figure files under the file designation 'figures'.
 - The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing. All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files uploaded as main manuscript documents will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The files uploaded as title page will be blinded from review and not converted into HTML and PDF. The main manuscript document file must contain the entire manuscript including abstract, text, references, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Dental Traumatology* will be reviewed by two experts in the field. *Dental Traumatology* uses double blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper and the name(s) of the author(s) will not be disclosed to the reviewers.

To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files.

Please upload:

- Your manuscript without title page under the file designation 'main document'.
- Figure files under the file designation 'figures'.
- The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'.

All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.5. Suggest a Reviewer

Dental Traumatology attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well. When the review is done you will be notified under 'Manuscripts with decision' and through e-mail.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully

in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Center' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. Please also remember to upload your manuscript document separate from your title page.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles in all areas related to adult and pediatric dental traumatology are of interest to *Dental Traumatology*. Examples of such areas are Epidemiology and Social Aspects, Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations, Pediatrics and Orthodontics, Oral and Maxillofacial Surgery/ Transplants / Implants, Esthetics / Restorations / Prosthetics and Prevention and Sports Dentistry.

Review Papers: *Dental Traumatology* commissions review papers of comprehensive areas and mini reviews of small areas. The journal also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site and are subject to peer-review.

Comprehensive Reviews should be a complete coverage of a subject discussed with the Editor in Chief prior to preparation and submission. Comprehensive review articles should include a description of search strategy of relevant literature, inclusion criteria, evaluation of papers and level of evidence.

Mini Reviews are covering a smaller area and may be written in a more free format.

Case Reports: *Dental Traumatology* accepts Case Reports but these will only be published online and will not be included in the printed version unless specifically requested by the Editor-in-Chief.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable, but their merit needs to provide high priority for publication in the journal. They should be kept within 3-4 printed pages and need not follow the usual division into material and methods etc, but should have an abstract. The introduction should be kept short. Thereafter the case is described followed by a discussion.

Short Communications of 1-2 pages are accepted for quick publication. These papers need not follow the usual division into Material and Methods, etc., but should have an abstract. They should contain important new information to warrant publication and may reflect improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches. They should conform to a high scientific and a high clinical practice standard.

Letters to the Editor, if of broad interest, are encouraged. They may deal with material in papers published in *Dental Traumatology* or they may raise new issues, but should have important implications.

Meetings: advance information about and reports from international meetings are welcome, but should not be submitted via the online submission site, but send directly to the Editorial Office: Justine Casas EDToffice@wiley.com

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and

arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used. Consult the following sources for additional abbreviations: 1) CBE Style Manual Committee. Scientific style and format: the CBE manual for authors, editors, and publishers. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994; and 2) O'Connor M, Woodford FP. Writing scientific papers in English: an ELSE-Ciba Foundation guide for authors. Amsterdam: Elsevier-Excerpta Medica; 1975.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation. Use double spacing when writing.

5.2. Structure

All papers submitted to *Dental Traumatology* should include: Title Page, Abstract, Main text, References and Tables, Figures, Figure Legends, Conflict of Interest Statement and Acknowledgements where appropriate. Title page, Conflict of Interest Statement and any Acknowledgements must be submitted as separate files and uploaded under the file designation Title Page to allow blinded review. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal style will be returned to the author(s).

Title Page: should be uploaded as a separate document in the submission process under the file designation 'Title Page' to allow blinded review. It should include: Full title of the manuscript, author(s)' full names (Family names should be underlined) and institutional affiliations including city, country, and the name and address of the corresponding author. If the author does not want the e-mail address to be published this must be clearly indicated. The title page should also include a running title of no more than 60 characters and 3-6 keywords.

Abstract is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract

should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings: Background/Aim, Material and Methods, Results and Conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles should be divided into Introduction, Material and Methods, Results and Discussion. During the editorial process reviewers and editors frequently need to refer to specific portions of the manuscript, which is difficult unless the pages are numbered. Authors should number all of the pages consecutively.

Introduction should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. Give only strict and pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported. The introduction should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation or hypothesis tested.

Materials and Methods must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. Describe your selection of observational or experimental participants clearly. Identify the method, apparatus and procedures in sufficient detail. Give references to established methods, including statistical methods, describe new or modify methods. Identify precisely all drugs used including generic names and route of administration.

(i) *Clinical trials* should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

(ii) *Experimental subjects*: experimentation involving human subjects will only be published

if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration (version, 2008 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

(iii) *Suppliers of materials* should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Present your results in logical sequence in the text, tables and illustrations giving the main or most important findings first. Do not duplicate data in graphs and tables.

Discussion may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the Introduction or of the Results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Link the conclusions to the aim of the study. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Main Text of Review Articles comprises an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential

grant holders should be listed. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

5.3. References

As the Journal follows the Vancouver system for biomedical manuscripts, the author is referred to the publication of the International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Int Med* 1997;126:36-47.

Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in texts, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). Use the style of the examples below, which are based on the format used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. For abbreviations of journals, consult the 'List of the Journals Indexed' printed annually in the January issue of Index Medicus.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp